

# Document made available under the Patent Cooperation Treaty (PCT)

International application number: PCT/KR05/000472

International filing date: 22 February 2005 (22.02.2005)

Document type: Certified copy of priority document

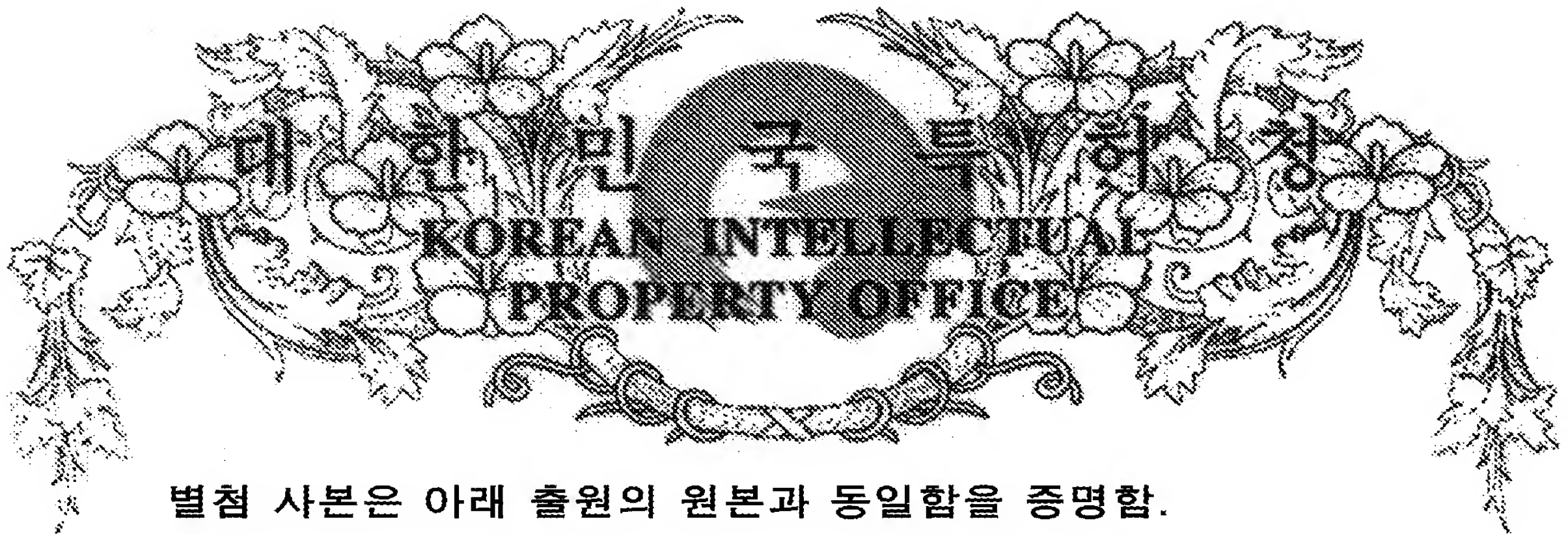
Document details: Country/Office: KR  
Number: 10-2004-0089372  
Filing date: 04 November 2004 (04.11.2004)

Date of receipt at the International Bureau: 17 May 2005 (17.05.2005)

Remark: Priority document submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b)



World Intellectual Property Organization (WIPO) - Geneva, Switzerland  
Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle (OMPI) - Genève, Suisse



별첨 사본은 아래 출원의 원본과 동일함을 증명함.

This is to certify that the following application annexed hereto  
is a true copy from the records of the Korean Intellectual  
Property Office

출 원 번 호 : 특허출원 2004년 제 0089372 호  
Application Number 10-2004-0089372

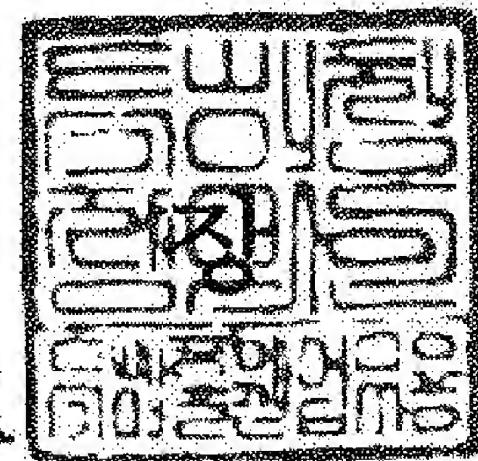
출 원 일 자 : 2004년 11월 04일  
Date of Application NOV 04, 2004

출 원 인 : 한국생명공학연구원  
Applicant(s) Korea Research Institute of Bioscience and  
Biotechnology

2005 년 04 월 07 일

특 허 청

COMMISSIONER



**【서지사항】**

**【서류명】** 특허출원서

**【권리구분】** 특허

**【수신처】** 특허청장

**【제출일자】** 2004. 11. 04

**【발명의 국문명칭】** 신규 아비에탄 디터페노이드계 화합물 및 이를 유효성분으로 함유하는 심장순환계 질환의 예방 및 치료용 조성물

**【발명의 영문명칭】** Novel abietane diterpenoid compounds for prevention and treatment of cardiovascular disease and the composition comprising the same

**【출원인】**

**【명칭】** 한국생명공학연구원

**【출원인코드】** 3-1999-034166-5

**【대리인】**

**【성명】** 이원희

**【대리인코드】** 9-1998-000385-9

**【포괄위임등록번호】** 2002-029927-3

**【발명자】**

**【성명의 국문표기】** 정태숙

**【성명의 영문표기】** JEONG, Tae-Sook

**【주민등록번호】** 580117-2026112

**【우편번호】** 302-120

**【주소】** 대전광역시 서구 둔산동 957번지 파랑새아파트 101-1101

**【국적】** KR

**【발명자】**

**【성명의 국문표기】** 이우송

**【성명의 영문표기】** LEE, Woo-Song

**【주민등록번호】** 640302-1923816

【우편번호】	305-755
【주소】	대전광역시 유성구 어은동 한빛아파트 113-602
【국적】	KR
【발명자】	
【성명의 국문표기】	조경현
【성명의 영문표기】	CH0,Kyung-Hyun
【주민등록번호】	680720-1927225
【우편번호】	305-340
【주소】	대전광역시 유성구 도룡동 과기원아파트 2-305
【국적】	KR
【발명자】	
【성명의 국문표기】	김주령
【성명의 영문표기】	KIM,Ju-Ryoung
【주민등록번호】	750205-2551716
【우편번호】	305-804
【주소】	대전 유성구 신성동 148-1 한솔빌라 302호
【국적】	KR
【발명자】	
【성명의 국문표기】	임경란
【성명의 영문표기】	IM,Kyoung-Ran
【주민등록번호】	811029-2448918
【우편번호】	302-170
【주소】	대전 서구 갈마동 328-4번지
【국적】	KR
【발명자】	
【성명의 국문표기】	장기창
【성명의 영문표기】	JANG,Ki-Chang
【주민등록번호】	730801-1899916

**【우편번호】** 690-150  
**【주소】** 제주도 제주시 오등동 1696번지 난지농업연구소 관사 4-3호  
**【국적】** KR  
**【공지예외적용대상증명서류의 내용】**  
**【공개형태】** 간행물 발표  
**【공개일자】** 2004.10.21  
**【심사청구】** 청구  
**【취지】** 특허법 제42조의 규정에 의한 출원, 특허법 제60조의 규정에 의한 출원심사를 청구합니다. 대리인  
 이원희 (인)  
**【수수료】**  
**【기본출원료】** 0 면 38,000 원  
**【가산출원료】** 28 면 0 원  
**【우선권주장료】** 0 건 0 원  
**【심사청구료】** 11 항 461,000 원  
**【합계】** 499,000 원  
**【감면사유】** 정부출연연구기관  
**【감면후 수수료】** 249,500 원  
**【첨부서류】** 1. 공지예외적용대상(신규성상실의예외, 출원시의특례)규정을 적용받기 위한 증명서류\_1통

## 【요약서】

### 【요약】

본 발명은 비자나무 추출물로부터 분리된 신규 아비에탄 디터페노이드계 화합물 및 이를 유효성분으로 포함하는 심장순환계 질환의 예방 및 치료용 약학적 조성물에 관한 것으로, 상세하게는 본 발명의 신규 화합물은 저밀도 지질 단백질에 대한 우수한 항산화 활성을 나타내므로, 이를 포함하는 조성물은 저밀도 지질 단백질의 산화에 의해 유발되는 고지혈증 또는 동맥경화증과 같은 심장순환계 질환의 예방 및 치료를 위한 용도로 광범위하게 사용될 수 있다.

### 【색인어】

아비에탄 디터페노이드계 화합물, 고지혈증, 동맥경화, 약학적 조성물.

## 【명세서】

### 【발명의 명칭】

신규 아비에탄 디테페노이드계 화합물 및 이를 유효성분으로 함유하는 심장순환계 질환의 예방 및 치료용 조성물{Novel abietane diterpenoid compounds for prevention and treatment of cardiovascular disease and the composition comprising the same}

### 【발명의 상세한 설명】

### 【발명의 목적】

### 【발명이 속하는 기술분야 및 그 분야의 종래기술】

<1> 본 발명은 비자나무 추출물로부터 분리된 신규 아비에탄 디테페노이드계 화합물 및 이를 유효성분으로 포함하는 심장순환계 질환의 예방 및 치료용 약학적조성물에 관한 것이다.

<2> 최근 성인병 증가와 아울러 동맥경화증 등 혈관장애질환이 크게 증가되고 있다. 동맥경화는 뇌동맥 또는 관상동맥에서 일어나기 쉬운데, 뇌동맥경화증의 경우에는 두통, 현기증, 정신장애를 나타내고 뇌연화증의 원인이 되며, 관상동맥경화증의 경우에는 심장부에 동통과 부정맥을 일으켜 협심증, 심근경색 등의 원인이 되는 것으로 알려져 있다. 또한 이로 인해 고혈압, 심장병, 뇌일혈 등이 유발되어, 동맥경화증으로 인한 질병이 현대 사회에 있어, 특히 50~60대의 남성들에게 가장 큰 사망요인으로 부각되고 있다.

<3> 혈중 콜레스테롤 농도가 높으면 관상동맥성 심혈관 질환이 유발되기 쉬우므로, 혈중 콜레스테롤 농도를 줄이기 위해서는 콜레스테롤 및 지방의 섭취를 줄이는 식이요법을 시행하거나 지질대사와 관련된 효소를 저해함으로써 콜레스테롤의 흡수를 억제해야 한다.

<4> 따라서, 이러한 질병을 예방하려는 목적으로 종전부터 콜레스테롤 흡수의 억제와 생합성의 저해를 통한 혈장 저밀도 지질 단백질(low-density lipoprotein; LDL)량을 감소시키려는 시도가 진행되어 왔다 (Principles in Biochemistry, lipid biosynthesis, 770-817, 3rd Edition, 2000 Worth Publishers, New York; Steinberg, *N. Engl. J. Med.*, 320:915-924, 1989).

<5> 최근에는 죽상경화(atherosclerosis)의 요인으로 혈액내 LDL 산화물의 생성이 주요관심의 대상이 되고 있으며(*Circulation*, 91:2488-2496, 1995; *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 17:3338-3346, 1997), 특히 LDL의 과도산화와 구조변형을 통해 생성된 HM-LDL(highly modified LDL)의 대식세포(macrophage)로의 유입에 따른 거품세포(foam cell) 생성이 밝혀짐에 따라 LDL 퍼옥사이드의 생성요인과 제거에 관한 연구가 활발히 진행되고 있다(*Curr. Atheroscler. Res.*, 2:363-372, 2000).

<6> 혈관벽내에 플라그(plaque) 형성과 파열은 심근경색 발병에 주요한 요인이며, 동맥경화는 혈관벽의 손상에 대한 만성 염증과정으로, 손상기작보다는 오히려 방어기작으로 제시되고 있다(*Circ. Res.*, 89:298-304, 2001).

<7> 현재 고지혈증 치료제로 사용되고 있는 프로부콜(Probucol), N,N'-디페닐렌



디아민(N,N'-diphenylenediamine), 페놀계 합성 항산화제인 BHA (butylatedhydroxyanisol)와 BHT(butylated hydroxy toluene)는 LDL 콜레스테롤을 감소시키고, 산화정도를 약화시키며 병변형성을 감소시켜 항산화력은 우수하나, 부작용이 많아 사용이 제한되고 있다.

<8> 따라서, 고지혈증이나 동맥경화 환자에 있어서 LDL 항산화제와 함께 지질강화제의 병행투여 요법에 대한 관심도가 높아지고 있다.

<9> 한편, 비자(榧子, *Torreya nucifera*)는 주목과(Taxaceae)에 속하는 상록 침엽교목으로 전 세계적으로 우리나라와 일본에만 제한되어 분포한다. 비자나무는 식용, 관상용, 공업용, 약용으로 쓰이고, 종자는 먹거나 기름을 짜내서 이용한다. 또한, 한방과 민간에서는 과실을 구충, 발모, 건위, 조경, 장출혈 등에 약재로 이용하고, 목재는 건축재, 기구재, 선박용재 등에 사용한다(김태정, 한국의 자원식물 I, p40, 서울대학교 출판부, 1996; 육창수, 아세아 생약도감, p23, 도서출판 경원, 1997). 비자나무의 잎과 종자에서 분리·보고된 성분으로는 세스퀴테르페노이드 (Sakai T., et al., *Bull. Chem. Soc. Japan*, 38:381, 1965), 라브단(labdane) 계열과 아비에탄(abietane) 계열 디테르페노이드(Sayama Y., et al, *Agric. Bio. Chem.*, 35:1068, 1971; Harrison L. and Asakawa Y., *Phytochemistry*, 26:1211, 1987), 그리고 플라보노이드(Kariyone T. and Sawaka T., *Ykugaku Zasshi*, 78:1010, 1958) 등이 있다.

<10> 이에, 본 발명자들은 부작용이 적은 새로운 고지혈증, 동맥경화증 치료제를 천연물에서 탐색하던 중, 비자나무 추출물로부터 분리된 아비에탄 디테르페노이드계

화합물에서 저밀도 지질 단백질에 대한 우수한 항산화 활성을 확인하여 본 발명을 완성하였다.

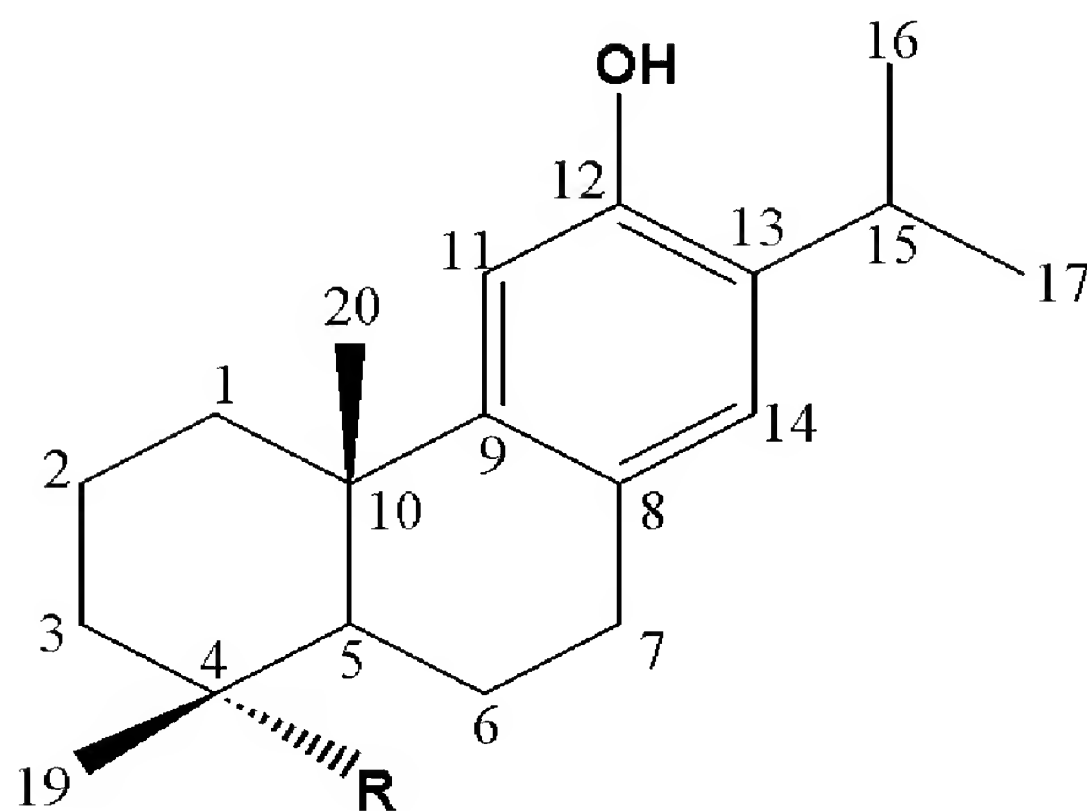
### 【발명이 이루고자 하는 기술적 과제】

<11> 본 발명은 비자나무 추출물로부터 분리된 신규 아비에탄 디터페노이드계 화합물 및 이를 유효성분으로 포함하는 심장순환계 질환의 예방 및 치료용 약학적 조성물을 제공하고자 한다.

### 【발명의 구성】

<12> 상기 목적에 따라, 본 발명은 하기 일반식 I 로 표기되는 아비에탄 디터페노이드계 화합물을 제공한다.

### 【화학식 1】



<13> ( I )

<14> 상기 식에서,

<15> R은 메틸에스테르 또는 디메톡시메틸이다.

<16> 상기 일반식 I 의 아비에탄 디테페노이드계 화합물은 12-히드록시아비에텍-8,11,13-트리엔-18-오익에시드메틸에스테르 및 12-히드록시아비에텍-8,11,13-트리엔-18-디메틸아세탈이고, 약학적으로 허용되는 염의 형태로 사용될 수 있으며, 통상의 방법에 의해 제조되는 모든 염, 수화물 및 용매화물이 포함된다.

<17> 본 발명은 상기 일반식 I 의 아비에탄 디테페노이드계 화합물을 유효성분으로 포함하고, 약학적으로 허용 가능한 담체, 희석제 또는 부형제를 포함하는 심장순환계 질환의 예방 및 치료용 약학적조성물을 제공한다.

<18> 또한, 본 발명은 비자나무 잎(*Torreya nucifera* leaf)의 추출물로부터 아비에탄 디테페노이드계 화합물을 제조하는 제조방법을 제공한다.

<19> 상기의 아비에탄 디테페노이드계 화합물은 비자나무 잎의 추출물로부터 통상의 추출 및 분리공정을 통하여 수득가능한데,

<20> 구체적으로 본 발명의 화합물은

<21> 비자나무 잎으로부터 에탄올 가용성 조추출물을 제조하는 제 1단계;

<22>           상기 1단계의 조추출물로부터 비극성 용매 가용추출물을 제조하는 제 2단계;  
및

<23>           상기 2단계의 비극성 용매 가용추출물, 바람직하게는 에틸아세테이트 가용추출물을 크로마토그래피로 분획화하여 화합물을 분리 및 정제하는 제 3단계의 제조공정을 통하여 제조 가능하다.

<24>           예를 들어, 비자나무 잎의 추출물로부터 아비에탄 디터페노이드계 화합물을 수득하기 위한 분리공정을 보다 구체적으로 설명하면,

<25>           건조된 비자나무 잎에 에탄올을 가하여 상온에서 3주 동안 방치한 다음, 여과지로 여과하고 농축하여 조추출물인 유성물질을 얻는 제 1단계;

<26>           상기 1단계의 조추출물에 물을 가하여 현탁시키고, 비극성 용매, 바람직하게는 n-헥산, 클로로포름 및 에틸아세테이트 순으로 분획화하여, n-헥산 가용추출물, 클로로포름 가용추출물 및 에틸아세테이트 가용추출물을 얻는 단계; 및

<27>           상기 2단계의 에틸아세테이트 가용추출물을 에틸아세테이트와 n-헥산의 혼합용매를 이동상 용매로, 바람직하게는 n-헥산:에틸아세테이트=90:10 내지 50:50(v/v)의 용매조건으로, 더욱 바람직하게는, 두 번에 걸쳐 실리카겔 컬럼 크로마토그래피를 수행하여, 황산화 활성이 높은 분획물을 선정하고, 분취용 박층 크로마토그래피(pre-TLC)를 수행하는데, 실리카겔을 고정상으로 하고, 클로로포름:메탄올 80:1(v/v)비의 전개용매조건으로 전개시켜 분획한 후, 수득한 분획물을 모아 세파덱스 LH-20(sephadex LH-20) 컬럼을 고정상으로 하고 클로로포름:메탄올 1:1(v/v)비를 이동상으로 하는 오픈 컬럼 크로마토그래피를 수행하여 정제된 분획

물을 얻고, 이 분획물로부터 본 발명의 아비에탄 디터페노이드계 화합물들을 분리하는 제 3단계의 제조공정을 통하여 수득이 가능하다.

<28> 또한, 본 발명의 화합물들은 당업계에서 잘 알려진 합성방법(Herbert O. House, Modern Synthetic Reactions, The Benjamin Cummings Publishing Company, 1972)이나 제조공정을 통하여 당업자가 용이하게 제조가능하다.

<29> 상기의 제조공정을 통하여 분리된 화합물들은 분광학적 데이터(spectroscopic data)를 이용하여 구조분석이 가능하다.

<30> 또한, 상기의 분리된 화합물들의 저밀도 지질단백질에 대한 항산화 활성을 티비에이알에스(TBARS) 방법으로 측정한 결과, 저밀도 지질단백질의 산화에 대해 저해효과를 나타내어, 본 발명 화합물들의 우수한 항산화 활성을 확인하였다(표 1 참조).

<31> 본 발명의 화합물들은 저밀도 지질단백질의 산화에 대해 저해효과를 나타내는 항산화 활성이 있으므로, 저밀도 지단백질의 산화에 의해 유발되는 고지혈증 또는 동맥경화증과 같은 심장순환계 질환의 질병 및 치료에 사용 가능하다.

<32> 본 발명의 조성물은, 조성물 총 중량에 대하여 상기 화합물을 0.0001 내지 50 중량%로 포함한다.

<33> 본 발명의 조성물은 상기 아비에탄 디터페노이드계 화합물에 추가로 동일 또는 유사한 기능을 나타내는 유효성분을 1종 이상 함유할 수 있다.

<34> 본 발명의 조성물은, 투여를 위해서 상기 기재한 유효성분 이외에 추가로 약제학적으로 허용 가능한 담체를 1종 이상 포함하여 제조할 수 있다. 약제학적으로

허용 가능한 담체는 식염수, 멸균수, 링거액, 완충 식염수, 텍스트로즈 용액, 말토 텍스트린 용액, 글리세롤, 에탄올 및 이들 성분 중 1 성분 이상을 혼합하여 사용할 수 있으며, 필요에 따라 항산화제, 완충액, 정균제 등 다른 통상의 첨가제를 첨가할 수 있다. 또한 희석제, 분산제, 계면활성제, 결합제 및 윤활제를 부가적으로 첨가하여 수용액, 현탁액, 유탁액 등과 같은 주사용 제형, 환약, 캡슐, 과립 또는 정제로 제제화할 수 있다. 더 나아가 당해 기술분야의 적정한 방법으로 또는 레알드의 문헌(Remington's Pharmaceutical Science(최근판), Mack Publishing Company, Easton PA)에 개시되어 있는 방법을 이용하여 각 질환에 따라 또는 성분에 따라 바람직하게 제제화할 수 있다.

<35>        본 발명의 조성물은 목적하는 방법에 따라 비경구 투여(예를 들어 정맥 내, 피하, 복강 내 또는 국소에 적용)하거나 경구 투여할 수 있으며, 투여량은 환자의 체중, 연령, 성별, 건강상태, 식이, 투여시간, 투여방법, 배설율 및 질환의 중증도 등에 따라 그 범위가 다양하다. 일일 투여량은 화합물의 경우 약 0.1~100mg/kg 이고, 바람직하게는 0.5~10mg/kg 이며, 하루 일회 내지 수회에 나누어 투여하는 것이 더욱 바람직하다.

<36>        본 발명의 화합물을 마우스에 경구 투여하여 독성 실험을 수행한 결과, 경구 투여 독성시험에 의한 50% 치사량(LD<sub>50</sub>)은 적어도 1,000mg/kg 이상인 안전한 물질로 판단된다.

<37>        본 발명의 조성물은 심장순환계 질환의 예방 및 치료를 위하여 단독으로, 또

는 수술, 호르몬 치료, 약물 치료 및 생물학적 반응 조절제를 사용하는 방법들과 병용하여 사용할 수 있다.

<38>           본 발명의 조성물은 심장순환계 질환의 개선을 목적으로 건강식품에 첨가될 수 있다. 본 발명의 화합물을 식품 첨가물로 사용할 경우, 상기 아비에탄 디터페노이드계 화합물을 그대로 첨가하거나 다른 식품 또는 식품 성분과 함께 사용될 수 있고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용될 수 있다. 유효 성분의 혼합량은 사용 목적(예방, 건강 또는 치료적 처치)에 따라 적합하게 결정될 수 있다. 일반적으로, 식품 또는 음료의 제조시에는 본 발명의 화합물은 원료에 대하여 1~20 중량%, 바람직하게는 5~10 중량%의 양으로 첨가된다. 그러나, 건강 및 위생을 목적으로 하거나 또는 건강 조절을 목적으로 하는 장기간의 섭취의 경우에는 상기 양은 상기 범위 이하일 수 있으며, 안전성 면에서 아무런 문제가 없기 때문에 유효성분은 상기 범위 이상의 양으로도 사용될 수 있다.

<39>           상기 식품의 종류에는 특별한 제한은 없다. 상기 물질을 첨가할 수 있는 식품의 예로는 육류, 소세지, 빵, 초코렛, 캔디류, 스낵류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 아이스크림류를 포함한 낙농제품, 각종 스프, 음료수, 차, 드링크제, 알콜 음료 및 비타민 복합제 등이 있으며, 통상적인 의미에서의 건강식품을 모두 포함한다.

<40>           본 발명의 건강음료 조성물은 통상의 음료와 같이 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있다. 상술한 천연 탄수화물은 포도당, 과당과 같은 모노사카라이드, 말토스, 슈크로스와 같은 디사카라이드, 및 텍스

트린, 사이클로텍스트린과 같은 폴리사카라이드, 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당알콜이다. 감미제로서는 타우마틴, 스테비아 추출물과 같은 천연 감미제나, 사카린, 아스파르탐과 같은 합성 감미제 등을 사용할 수 있다. 상기 천연 탄수화물의 비율은 본 발명의 조성물 100mℓ당 일반적으로 약 0.01 내지 0.04g, 바람직하게는 약 0.02 내지 0.03g 이다.

<41>           상기 외에 본 발명의 조성물은 여러가지 영양제, 비타민, 전해질, 풍미제, 착색제, 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알콜, 탄산 음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있다. 그밖에 본 발명의 조성물은 천연 과일주스, 과일주스 음료 및 야채 음료의 제조를 위한 과육을 함유할 수 있다. 이러한 성분은 독립적으로 또는 조합하여 사용할 수 있다. 이러한 첨가제의 비율은 크게 중요하진 않지만 본 발명의 조성물 100 중량부 당 0.01 내지 0.1 중량부의 범위에서 선택되는 것이 일반적이다.

<42>           이하, 본 발명을 실시예, 실험예 및 제제예에 의해 상세히 설명한다. 단, 하기 실시예, 실험예 및 제제예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예, 실험예 및 제제예에 의해 한정되는 것은 아니다.

<43>   **실시예 1. 본 발명의 화합물 제조**

<44>   **단계 1 : 비자나무 잎의 조추출물의 제조**



<45> 건조된 비자나무(제주도, 대한민국)잎 2.16 kg에 100% 에탄올(EtOH) 18 ℓ를 가하여 실온에서 3주 동안 방치시킨 후, 여과지로 여과하고 농축하여 비자나무 잎의 조추출물인 유성물질 42 g을 수득하였다.

<46> 단계 2 : 비자나무 잎의 비극성 용매 가용추출물의 제조

<47> 상기 단계 1에서 얻은 비자나무 잎 조추출물에 물 1000 ml을 가하여 현탁시키고, n-헥산(*n*-hexane), 클로로포름( $\text{CHCl}_3$ ) 및 에틸아세테이트(EtOAc) 순으로 분획하여, n-헥산 가용추출물(*n*-hexane-soluble) 75 g, 클로로포름 가용추출물( $\text{CHCl}_3$ -soluble) 37 g 및 에틸아세테이트 가용추출물(EtOAc-soluble) 18 g을 각각 수득하였다.

<48> 에틸아세테이트층으로부터 얻은 노란색 유성물질을 하기 실험에 3과 같은 방법으로 항산화능을 관찰한 결과, 40  $\mu\text{g}/\text{ml}$  농도에서 저밀도 지질단백질에 대한 85%의 항산화 효과를 나타내어, 우수한 항산화 활성이 있음을 확인하였다.

<49> 단계 3 : 비자나무 잎의 에틸아세테이트 가용추출물의 분획화 및 본 발명의 화합물의 분리

<50> 상기 단계 2에서 수득한 에틸아세테이트 가용추출물 18 g을 실리카겔 컬럼 크로마토그래피와 이동상 용매로 n-헥산과 에틸아세테이트의 혼합용매를 사용하여 두 단계로 분리하였다.

<51> 우선, 첫 번째로 실리카겔 컬럼 크로마토그래피(실리카겔 : Merk, Art 9385, 컬럼크기 :  $\phi 7 \times 40$  cm)에 n-헥산:EtOAc = 98:2, 97:3, 95:5, 10:1, 5:1, 3:1, 1:1 및 EtOAc 100%(v/v)의 이동상 용매조건으로 각각 1.5 ℓ 씩을 전개시켜, 17개 분획물(Fr.1~17)을 수득하였으며, 각 분획물의 항산화 활성을 하기 실험에 3과 같은 방법으로 관찰한 결과, 가장 우수한 항산화 활성을 나타내는 8번 분획물(Fr.8, 헥산:EtOAc=5:1 및 3:1 용매조건, 수득량 593 mg)대하여, 두 번째 실리카겔 컬럼 크로마토그래피법을 수행하였다. 이때, n-헥산:EtOAc=98:2, 95:5, 10:1, 5:1, 3:1, 1:1 및 EtOAc 100%(v/v)의 이동상 용매조건으로 각각 100 ml씩을 전개시켜, 11개 분획물(Fr.1~11)을 수득하였으며, 각 분획물의 항산화 활성을 관찰하였다. 관찰 결과, 항산화 활성이 가장 뛰어난 8번부터 10번 분획의 혼합물(Fr.8~10, n-헥산:EtOAc = 5:1 내지 1:1 용매조건, 149 mg)은 프렙 TLC(prepare TLC, Silica gel 60F<sub>254</sub>, Merck, Art 5744, CHCl<sub>3</sub>/MeOH = 80:1의 이동상 용매조건) 및 세파덱스 LH-20 컬럼(sephadex LH-20 column, Sigma-Aldrich Co., USA, CHCl<sub>3</sub>/MeOH = 1:1의 용매조건)을 이용하여 정제된 두 가지의 화합물을 수득하였는데, 각 수득량은 1 kg당 하기 실시예 2의 구조분석 결과 확인된 12-히드록시아비에텍-8,11,13-트리엔-18-오익 에시드메틸에스테르 화합물이 17.5mg 및 12-히드록시아비에텍-8,11,13-트리엔-18-디메틸아세탈 화합물이 18 mg이었다.

<52> 실시예 2. 본 발명의 화합물의 구조 분석

<53>           상기 실시예 1을 통하여 얻은 물질은 VG 고분해능 GC/MS 분광기(VG high resolution GC/MS spectrometer, Election Ionization MS, Autospec-Ultima, Micromass, UK)를 사용하여 분자량 및 분자식을 결정하였으며, 선광도는 편광기(DIP-181 digital polarimeter, Jasco, Japan)를 사용하여 측정하였다. 또한 핵자기 공명(NMR) 분석(AMX 500, Bruker, Germany)을 통하여  $^1\text{H}$  NMR,  $^{13}\text{C}$  NMR, 호모-코지(HOMO-COSY), HMQC( $^1\text{H}$ -Detected heteronuclear Multiple-Quantum Coherence), HMBC(Heteronuclear Multiple-Bond Coherence), DEPT(Distortionless Enhancement by Polarization)스펙트럼을 얻고, 분자구조를 결정하였다.

<54>           이상의 기기분석결과를 발표된 문헌의 것과 비교 분석한 결과, 하기 물성치 1을 갖는 화학식 1의 화합물을 12-히드록시아비에틱-8,11,13-트리엔-18-오익에시드 메틸에스테르(*Chem. Nat. Compod (Engl. Transl)*, 24:447, 1988)로 동정하였다. 또한, 하기 물성치 2를 갖는 노란색 유성물질을 12-히드록시아비에틱-8,11,13-트리엔-18-디메틸아세탈로 동정하였으며, 상기 화합물은 아직 보고되지 않은 신규한 화합물로 확인하였다.

<55>           **1. 12-히드록시아비에틱-8,11,13-트리엔-18-오익에시드메틸에스테르**

<56>           1) 물성: 노란색 유성

<57>           2) 선광도:  $[\alpha]_{\text{D}}^{25} +75.7^\circ$  ( $c = 0.28$ , EtOH)

<58> 3) 분자량: 330

<59> 4) 분자식:  $C_{21}H_{30}O_3$

<60> 5)  $^1H$  NMR ( $CDCl_3$ , 500 MHz)  $\delta$  1.12 (s, 3H, H-20), 1.15 (d,  $J = 7.4$  Hz, 3H, H-16), 1.16 (d,  $J = 7.3$  Hz, 3H, H-17), 1.19 (s, 3H, H-19), 1.29 (m, 1H, H-6  $\alpha$ ), 1.41 (m, 1H, H-2  $\alpha$ ), 1.55-1.77 (m, 5H, H-1  $\alpha$ , H-2  $\beta$ , H-3, H-6  $\beta$ ), 2.12 (d like,  $J = 12.7$  Hz, 1H, H-1  $\beta$ ), 2.14 (dd,  $J = 1.7, 12.5$  Hz, 1H, H-5), 2.74 (m, 2H, H-7), 3.04 (m, 1H, H-15), 3.59 (s, 3H,  $CO_2Me$ ), 4.58 (s, -OH), 6.55 (s, 1H, H-11), 6.74 (s, 1H, H-14).

<61> 6)  $^{13}C$  NMR ( $CDCl_3$ , 125 MHz)  $\delta$  16.5 (C-19), 18.5 (C-2), 21.8 (C-6), 22.5 (C-16), 22.7 (C-17), 25.0 (C-20), 26.8 (C-15), 29.2 (C-7), 36.6 (C-1), 36.9 (C-4), 38.0 (C-3), 44.8 (C-5), 47.7 (C-10), 51.9 (-OMe), 110.8 (C-11), 126.7 (C-14), 127.0 (C-8), 131.7 (C-13), 147.9 (C-9), 150.8 (C-12), 179.2 (C-18)

<62> 2. 12-히드록시아비에택-8,11,13-트리엔-18-디메틸아세탈

<63> 1) 물성: 노란색 유성

<64> 2) 선광도:  $[\alpha]_D^{25} -5.8^\circ$  ( $c = 0.3$ ,  $CHCl_3$ )

<65> 3) 분자량: 346

<66> 4) 분자식:  $C_{22}H_{34}O_3$

<67> 5)  $^1H$  NMR ( $CDCl_3$ , 500 MHz)  $\delta$  0.9 (s, 3H, H-19), 1.12 (s, 3H, H-20), 1.15 (d,  $J$  = 7.2Hz, H-16), 1.16 (d,  $J$  = 7.2Hz, H-17), 1.27 (dt,  $J$  = 4.2, 12.7Hz, H-1a), 1.36-1.43 (m, 2H, H-3), 1.53-1.62 (m, 2H, H-2), 1.64-1.75 (m, 2H, H-6), 1.81 (dd,  $J$  = 1.7, 12.1 Hz, H-5), 2.05 (d like,  $J$  = 12.6Hz, H-1b), 6.55 (s, 1H, H-11), 6.75 (s, 1H, H-14).

<68> 6)  $^{13}C$  NMR ( $CDCl_3$ , 125 MHz)  $\delta$  16.7 (C-19), 18.3 (C-2), 19.4 (C-6), 22.5 (C-16), 22.7 (C-17), 25.2 (C-20), 26.7 (C-15), 29.3 (C-7), 30.4 (C-3), 37.3 (C-10), 38.2 (C-1), 42.6 (C-4), 42.8 (C-5), 58.7 (C-18b), 59.0 (C-18a), 110.9 (C-11), 113.3 (C-18), 126.5 (C-14), 126.9 (C-8), 131.4 (C-13), 148.7 (C-9), 150.7 (C-12).

<69> 7) EIMS (rel. int.)  $m/z$   $[M]^+$  59 (22%), 75 (100%), 189 (14%), 201 (10%), 346 (33%).

<70> **실험예 1. TBARS법을 이용한 본 발명 화합물의 항산화 활성 측정**

<71> 상기 본 발명의 화합물에 대하여 저밀도 지질 단백질에 대한 항산화 활성을 측정하기 위하여, 하기와 같은 실험을 수행하였다.

<72>  $\text{Cu}^{2+}$ 은 저밀도 지질 단백질의 산화를 유도( $\text{Cu}^{2+}$ -mediated LDL-oxidation)하는 것으로 알려져 있다. 따라서 본 발명에서는 이 때 생성된 불포화 지방산의 산화산물인 디알데하이드(dialdehyde)를 TBA(thiobarbituric acid)법으로 측정하여, 본 발명 화합물들의 항산화 활성을 측정하였다(Packer, L. Ed., *Methods in Enzymology*. Vol. 234, Oxygen radicals in biological systems Part D. Academic press, San Diego, 1994).

<73> 사람으로부터 혈장 300 ml를 채취하여, 초원심분리기로 100,000 x g에서 24시간 동안 원심분리하여 상층에 부유된 고밀도 지질단백질(VLDL)/킬로마이크론(chylomicron)층을 제거하고, 나머지 용액의 비중을 1.063 g/ml로 맞춘 후, 100,000 x g에서 24시간 동안 원심분리하여 다시 상층에 부유된 저밀도 지질 단백질 25 ml(1.5 ~ 2.5 mg 단백질/ml)을 분리하였다.

<74> 상기에서 분리한 저밀도 지질 단백질 20  $\mu\text{l}$ (단백질 농도, 50 ~ 100  $\mu\text{g/ml}$ )을 10 mM 인산완충용액(phosphate-buffered saline, PBS) 210  $\mu\text{l}$ 와 혼합하고, 상기 실시예 1에서 제조한 본 발명 화합물들의 용액을 각각 10  $\mu\text{l}$ 씩 첨가하였다. 이때, 본 발명의 화합물들은 DMSO(dimethylsulfoxide)에 녹여 사용하였으며, 실험에 사용하기 전에 여러 농도로 희석하였다. 음성 대조군으로는 용매인 DMSO 만을 첨가한 것을 사용하였으며, 양성 대조군으로는 프로부콜(Probucol)을 첨가한 것을 사용하였다.

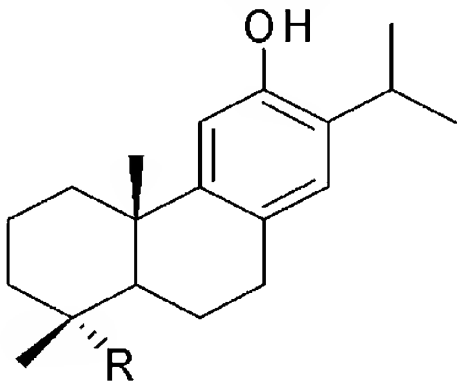
<75> 상기 용액에 0.25 mM  $\text{CuSO}_4$  10  $\mu\text{l}$ 를 첨가하여 37 °C에서 4시간 동안 반응시

키고, 20% 트리클로로아세트산(trichloroacetic acid, TCA) 용액 1 ml를 첨가하여 반응을 중지시켰다. 0.05N NaOH 용액에 녹인 0.67% TBA 용액 1 ml를 첨가하고 10초간 교반시킨 후 95 ℃에서 5분 동안 가열하여 발색 반응을 일으킨 다음, 얼음물로 용액을 냉각하였다. 이후, 용액을 3000 rpm에서 5분 동안 원심분리하여 상등액을 분리하였으며, 자외선-가시광선 분광기로 540 nm에서의 흡광도를 측정하여 상기 발색 반응으로 생성된 말론디알데하이드(malondialdehyde, MDA)의 양을 측정하였다.

<76> 한편, 말론디알데하이드의 표준곡선을 구하기 위하여, 말론알데하이드 비스(디메틸아세탈)[malonaldehyde bis(dimethylacetal)]의 저장용액을 이용하여 0~10 nmol 말론디알데하이드를 포함하는 PBS 표준용액을 250 μl씩 만들어 상기와 같은 방법으로 발색시키고 540 nm에서의 흡광도를 측정하여, 말론디알데하이드의 표준곡선을 구하였다. 상기 표준곡선을 이용하여 본 발명의 화합물들로부터 생성된 말론디알데하이드의 양을 정량하였다(표 1 참조).

【표 1】

<77> 본 발명 화합물들의 저밀도 지질 단백질에 대한 항산화 활성

화합물	R	IC <sub>50</sub> ( μ M)
	CO <sub>2</sub> Me	1.1
	CH(OMe) <sub>2</sub>	1.8
양성대조군(Probucol)		3.6

<78>           상기 표 1에서 보는 바와 같이, 본 발명의 화합물인 12-히드록시아비에텍-8,11,13-트리엔-18-오익에시드메틸에스테르 및 12-히드록시아비에텍-8,11,13-트리엔-18-디메틸아세탈 화합물들의 낮은 IC<sub>50</sub>값으로부터 저밀도 지질 단백질에 대한 우수한 항산화 활성을 확인하였다.

<79>           따라서, 본 발명의 화합물들은 저밀도 지질단백질의 산화에 의해 유발되는 것으로 알려진 고지혈증 또는 동맥경화증과 같은 심장순환계 질환의 예방 또는 치료에 유용하게 사용될 수 있다.

<80>           **실험예 2. 급성 독성실험**

<81>           본 발명의 화합물들에 대한 급성 독성을 알아보기 위하여, 하기와 같은 실험을 수행하였다.

<82>           4주령의 특정 병원체 부재(SPF, specific pathogens free) ICR계 마우스를 암수 각각 12 마리씩 4군(암수 각각 3마리/실험군)으로 나누어, 온도 22± 3℃, 습도 55± 10%, 조명 12L/12D의 동물실내에서 사육하였다. 마우스는 실험에 사용되기 전 1주일 정도 순화시켰다. 실험동물용 사료(마우스 및 랫트용, (주)제일제당, 서울, 대한민국) 및 음수는 멸균한 후 공급하였으며 자유 섭취시켰다.

<83>           상기 실시예 1에서 제조한 본 발명의 화합물들을 0.5% 트윈(tween) 80에 50



mg/ml 농도로 조제한 후, 마우스 체중 20 g 당 0.04 ml(100 mg/kg), 0.2 ml(500 mg/kg) 및 0.4 ml(1,000 mg/kg)씩 경구 투여하였다. 시료는 단회 경구 투여하였으며, 투여 후 7일 동안 다음과 같이 부작용 또는 치사 여부를 관찰하였다. 즉, 투여 당일은 투여 후 1시간, 4시간, 8시간, 12시간 뒤에, 그리고 투여 익일부터 7일째까지는 매일 오전, 오후 1회 이상씩 일반증상의 변화 및 사망동물의 유무를 관찰하였다.

<84> 또한, 투여 7일째에 동물을 치사시켜 해부한 후 육안으로 내부 장기를 검사하였다. 투여당일부터 1일 간격으로 체중의 변화를 측정하여 본 발명의 화합물들에 의한 동물의 체중 감소 현상을 관찰하였다.

<85> 상기와 같은 급성 독성실험 결과, 시료를 투여한 모든 마우스에서 특기할 만한 임상증상이 나타나지 않았고 폐사된 마우스도 없었으며, 또한 체중변화, 혈액검사, 혈액생화학 검사, 부검소견 등에서도 독성변화는 관찰되지 않았다.

<86> 따라서, 본 발명의 화합물들은 모든 마우스에서 1,000 mg/kg까지 독성변화를 나타내지 않았으며, 경구투여 최소치사량(LD<sub>50</sub>)이 1,000 mg/kg 이상인 안전한 물질로 판단되었다.

<87> 이하, 본 발명의 화합물을 포함하는 조성물의 제제예를 설명하나, 본 발명은 이를 한정하고자 함이 아닌 단지 구체적으로 설명하고자 함이다.

<88>     **제제예 1. 약학적 제제의 제조**

<89>             **1-1. 산제의 제조**

<90>             실시에 1의 화합물             2g

<91>             유당                     1g

<92>             상기의 성분을 혼합하고 기밀포에 충전하여 산제를 제조하였다.

<93>             **1-2. 정제의 제조**

<94>             실시에 1의 화합물             100mg

<95>             옥수수전분                 100mg

<96>             유 당                     100mg

<97>             스테아린산 마그네슘             2mg

<98>             상기의 성분을 혼합한 후, 통상의 정제의 제조방법에 따라서 타정하여 정제를 제조하였다.

<99>             **1-3. 캡슐제의 제조**

<100>            실시에 1의 화합물             100mg

<101>            옥수수전분                 100mg

<102> 유 당 100mg

<103> 스테아린산 마그네슘 2mg

<104> 상기의 성분을 혼합한 후, 통상의 캡슐제의 제조방법에 따라서 젤라틴 캡슐에 충전하여 캡슐제를 제조하였다.

<105> **1-4. 주사액제의 제조**

<106> 실시예 1의 화합물 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$

<107> 묽은 염산 BP pH 3.5로 될 때까지

<108> 주사용 염화나트륨 BP 최대 1ml

<109> 적당한 용적의 주사용 염화나트륨 BP 중에 실시예 1의 화합물을 용해시키고, 생성된 용액의 pH를 묽은 염산 BP를 사용하여 pH 3.5로 조절하고, 주사용 염화나트륨 BP를 사용하여 용적을 조절하고 충분히 혼합하였다. 용액을 투명유리로 된 5ml 타입 I 앰플 중에 충전시키고, 유리를 용해시킴으로써 공기의 상부 격자하에 봉입시키고, 120℃에서 15분 이상 오토클레이브시켜 살균하여 주사액제를 제조하였다.

<110> **제제예 2. 식품의 제조**

<111> 본 발명의 화합물을 포함하는 식품들을 다음과 같이 제조하였다.

<112> **2-1. 조리용 양념의 제조**

<113> 실시예 1의 화합물 0.2 ~ 10 중량%로 건강 증진용 조리용 양념을 제조하였다.

<114> **2-2. 토마토 케찹 및 소스의 제조**

<115> 실시예 1의 화합물 0.2 ~ 1.0 중량%를 토마토 케찹 또는 소스에 첨가하여 건강 증진용 토마토 케찹 또는 소스를 제조하였다.

<116> **2-3. 밀가루 식품의 제조**

<117> 실시예 1의 화합물 0.1 ~ 5.0 중량%를 밀가루에 첨가하고, 이 혼합물을 이용하여 빵, 케이크, 쿠키, 크래커 및 면류를 제조하여 건강 증진용 식품을 제조하였다.

<118> **2-4. 스프 및 육즙(gravies)의 제조**

<119> 실시예 1의 화합물 0.1 ~ 1.0 중량%를 스프 및 육즙에 첨가하여 건강 증진용 육가공 제품, 면류의 수프 및 육즙을 제조하였다.

<120> **2-5. 그라운드 비프(ground beef)의 제조**

<121> 실시예 1의 화합물 10 중량%를 그라운드 비프에 첨가하여 건강 증진용 그라운드 비프를 제조하였다.

<122>           **2-6. 유제품(dairy products)의 제조**

<123>           실시에 1의 화합물 0.1 ~ 1.0 중량%를 우유에 첨가하고, 상기 우유를 이용하여 버터 및 아이스크림과 같은 다양한 유제품을 제조하였다.

<124>           **2-7. 전식의 제조**

<125>           현미, 보리, 찹쌀, 율무를 공지의 방법으로 알파화시켜 건조시킨 것을 배전한 후 분쇄기로 입도 60메쉬의 분말로 제조하였다.

<126>           검정콩, 검정깨, 들깨도 공지의 방법으로 찌서 건조시킨 것을 배전한 후 분쇄기로 입도 60메쉬의 분말로 제조하였다.

<127>           실시에 1의 화합물을 진공 농축기에서 감압·농축하고, 분무, 열풍건조기로 건조하여 얻은 건조물을 분쇄기로 입도 60메쉬로 분쇄하여 건조분말을 얻었다.

<128>           상기에서 제조한 곡물류, 종실류 및 실시에 1의 화합물의 건조분말을 다음의 비율로 배합하여 제조하였다.

<129>           곡물류(현미 30중량%, 율무 15중량%, 보리 20중량%),

<130>           종실류(들깨 7중량%, 검정콩 8중량%, 검정깨 7중량%),

<131>           실시에 1의 화합물의 건조분말(1 중량%),

<132>           영지(0.5중량%),

<133> 지황(0.5중량%)

<134> 제제예 3. 음료의 제조

<135> 3-1. 탄산음료의 제조

<136> 설탕 5~10%, 구연산 0.05~0.3%, 카라멜 0.005~0.02%, 비타민 C 0.1~1%의 첨가물을 혼합하고, 여기에 79~94%의 정제수를 섞어서 시럽을 만들고, 상기 시럽을 85~98℃에서 20~180초간 살균하여 냉각수와 1:4의 비율로 혼합한 다음 탄산가스를 0.5~0.82% 주입하여 실시예 1의 화합물을 함유하는 탄산음료를 제조하였다.

<137> 3-2. 건강음료의 제조

<138> 액상과당(0.5%), 올리고당(2%), 설탕(2%), 식염(0.5%), 물(75%)과 같은 부재료와 실시예 1의 화합물을 균질하게 배합하여 순간 살균을 한 후 이를 유리병, 팩트병 등 소포장 용기에 포장하여 건강음료를 제조하였다.

<139> 3-3. 야채주스의 제조

<140> 실시예 1의 화합물 0.5g을 토마토 또는 당근 주스 1,000ml에 가하여 건강 증진용 야채주스를 제조하였다.

<141> 3-4. 과일주스의 제조

<142> 실시예 1의 화합물 0.1g을 사과 또는 포도 주스 1,000ml에 가하여 건강 증진용 과일주스를 제조하였다.

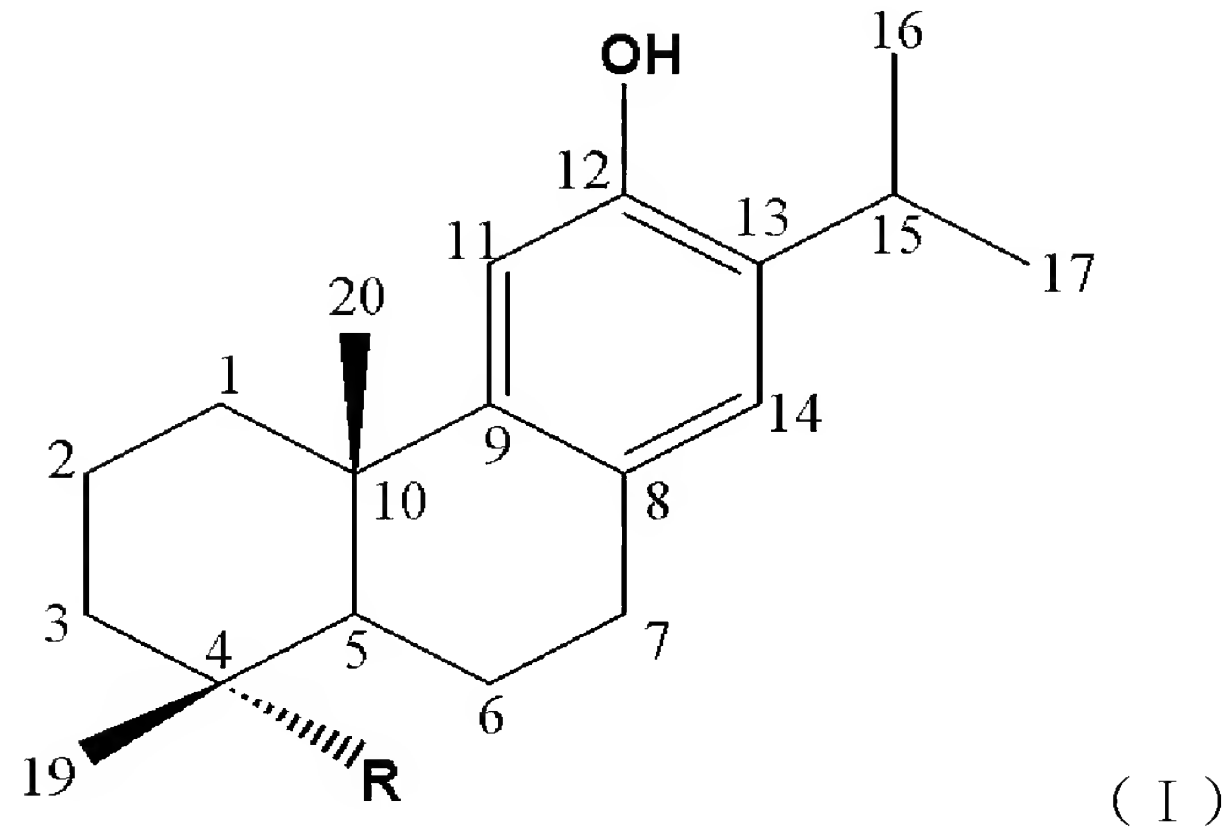
### 【발명의 효과】

<143> 본 발명의 아비에탄 디터페노이드계 화합물은 저밀도 지질 단백질에 대한 우수한 항산화 활성을 나타내므로, 이를 포함하는 조성물은 저밀도 지질 단백질의 산화에 의해 유발되는 고지혈증 또는 동맥경화증과 같은 심장순환계 질환의 예방 및 치료를 위한 용도로 광범위하게 사용될 수 있다.

【특허청구범위】

【청구항 1】

하기 일반식 I 로 표기되는 아비에탄 디테르페노이드계 화합물:



상기 식에서,

R은 메틸에스테르 또는 디메톡시메틸이다.

【청구항 2】

제 1항에 있어서, 비자나무의 잎으로부터 추출분리되는 것을 특징으로 하는 화합물.

【청구항 3】

( i ) 비자나무 잎으로부터 에탄올 가용성 조추출물을 제조하는 제 1단계;



(ii) 상기 조추출물로부터 비극성 용매 가용추출물을 제조하는 제 2단계; 및

(iii) 상기 비극성 용매 가용추출물을 크로마토그래피로 분획화하여 화합물을 분리 및 정제하는 제 3단계를 포함하는 제 1항의 아비에탄 디터페노이드계 화합물을 제조하는 방법.

#### 【청구항 4】

제 3항에 있어서, 비극성 용매 가용추출물은 에틸아세테이트 가용추출물인 것을 특징으로 하는 방법.

#### 【청구항 5】

제 3항에 있어서, 크로마토그래피는 n-헥산:에틸아세테이트=90:10 내지 50:50(v/v)의 용매조건으로 수행되는 것을 특징으로 하는 방법.

#### 【청구항 6】

제 5항에 있어서, n-헥산:에틸아세테이트=90:10 내지 50:50(v/v)의 용매조건으로 크로마토그래피를 추가적으로 수행하는 것을 특징으로 하는 방법.

#### 【청구항 7】

제 1항의 아비에탄 디터페노이드계 화합물을 유효성분으로 포함하고, 약학적

으로 허용 가능한 담체, 희석제 또는 부형제를 포함하는 심장순환계 질환의 예방 및 치료용 약학적조성물.

#### **【청구항 8】**

제 7항에 있어서, 상기 화합물은 조성물 총 중량에 대하여 0.0001 내지 50 중량%로 포함하는 것을 특징으로 하는 약학적조성물.

#### **【청구항 9】**

제 7항에 있어서, 심장순환계 질환은 저밀도 지단백질의 산화에 의해 유발되는 고지혈증 또는 동맥경화증인 것을 특징으로 하는 약학적조성물.

#### **【청구항 10】**

제 1항의 아비에탄 디터페노이드계 화합물을 유효성분으로 함유하고, 식품학적으로 허용 가능한 식품보조 첨가제를 포함하는 심장순환계 질환의 예방 및 개선용 건강기능식품.

#### **【청구항 11】**

제 10항에 있어서, 건강음료인 것을 특징으로 하는 건강기능식품.